(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 7 月 8 日 (08.07.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/135563 A1

(51) 国际专利分类号:
A61L 27/36 (2006.01) *A61L 27/58* (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/123741

(22) 国际申请日: 2020 年 10 月 26 日 (26.10.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911394705.5 2019年12月30日 (30.12.2019) CN

(71) 申请人: **广东泓志生物科技有限公司 (GUANGDONG HONGZHI BIOTECHNOLOGY CO. LTD)** [CN/CN]; 中国广东省汕头市黄山路 30 街区珠业三街 2 号三楼 2 号房, Guangdong 515041 (CN)。

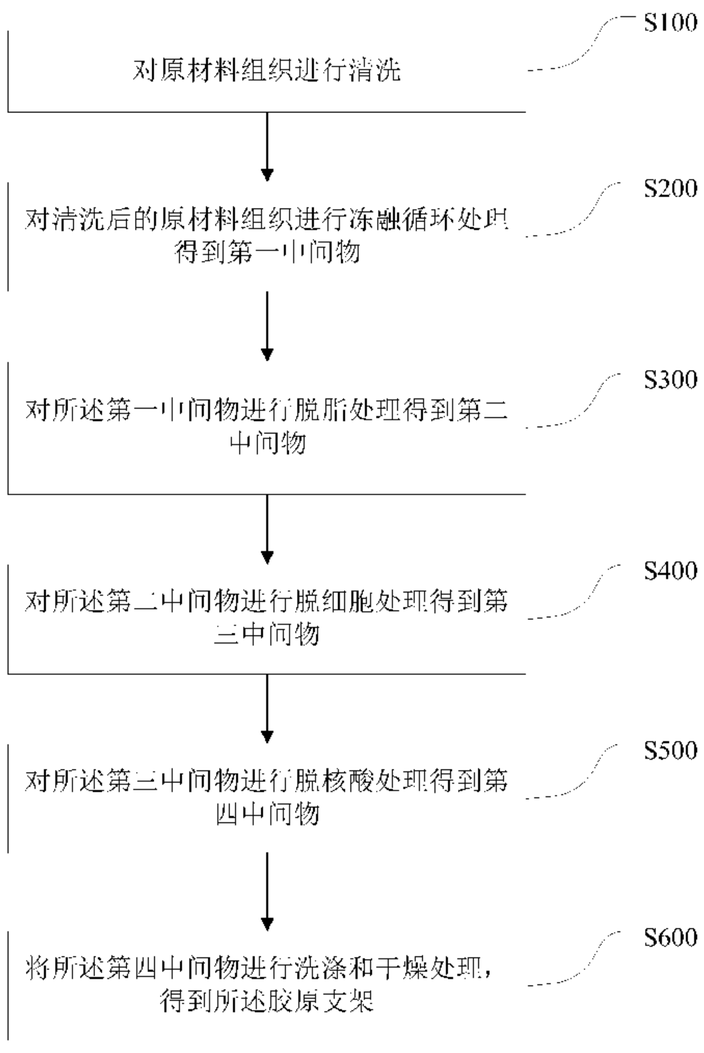
(72) 发明人: **万绵水 (WAN, Mianshui)**; 中国广东省汕头市黄山路30街区珠业三街2号三楼2号房, Guangdong 515041 (CN)。 **林创鑫 (LIN, Chuangxin)**; 中国广东省汕头市黄山路30街区珠业三街2号三楼2号房, Guangdong 515041 (CN)。

(74) 代理人: **北京酷爱智慧知识产权代理有限公司 (BEIJING KUAIZHIHUI IP AGENCY CO., LTD)**; 中国北京市海淀区中关村大街11号五层商业5B04, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) **Title:** COLLAGEN SCAFFOLD PREPARATION METHOD AND COLLAGEN SCAFFOLD

(54) **发明名称:** 胶原支架的制备方法及胶原支架



S100 Clean raw material tissues
S200 Carry out freeze-thaw cycle treatment on the cleaned raw material tissues to obtain a first intermediate
S300 Carry out ungrease treatment on the first intermediate to obtain a second intermediate
S400 Carry out decellularization treatment on the second intermediate to obtain a third intermediate
S500 Carry out nucleic acid removal treatment on the third intermediate to obtain a fourth intermediate
S600 Wash and dry the fourth intermediate to obtain the collagen scaffold

图 1

(57) **Abstract:** A collagen scaffold preparation method and a collagen scaffold. The preparation method comprises the steps: cleaning raw material tissues; carrying out freeze-thaw cycle treatment on the cleaned raw material tissues to obtain a first intermediate; carrying out ungrease treatment on the first intermediate to obtain a second intermediate; carrying out decellularization treatment on the second intermediate to obtain a third intermediate; carrying out nucleic acid removal treatment on the third intermediate to obtain a fourth intermediate; washing and drying the fourth intermediate to obtain the collagen scaffold; and carrying out nucleic acid removal treatment

[见续页]

WO 2021/135563 A1

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

by using a benzonase nuclease solution, wherein the content of benzonase nuclease is 100 U/L to 10000 U/L. The three-dimensional space constituted by the collagen scaffold prepared by using the preparation method can promote the proliferation and migration of seed cells, improve the stability of the expression of the seed cells according to the original phenotype thereof, and promote the secretion of a cell matrix, thereby improving the firmness of the scaffold.

(57) 摘要：一种胶原支架的制备方法及胶原支架。制备方法包括步骤：对原材料组织进行清洗；对清洗后的原材料组织进行冻融循环处理得到第一中间物；对第一中间物进行脱脂处理得到第二中间物；对第二中间物进行脱细胞处理得到第三中间物；对第三中间物进行脱核酸处理得到第四中间物；将第四中间物进行洗涤和干燥处理，得到胶原支架；采用全能核酸酶溶液进行脱核酸处理，全能核酸酶的含量为100U/L至10000U/L。采用所述制备方法制备的胶原支架，其构成的三维空间可以促进种子细胞的增殖与迁移、提高种子细胞按照其原始表型表达的稳定性，促进细胞基质的分泌从而增加支架的坚固性。

胶原支架的制备方法及胶原支架

技术领域

本发明涉及组织工程技术领域，具体涉及一种胶原支架的制备方法及胶原支架。

背景技术

组织工程（tissue engineering），是一门以细胞生物学和材料科学相结合，进行体外或体内构建组织或器官的新兴学科，其基本原理是，从机体获取少量的活体组织，用特殊的酶或其他方法将细胞（又称种子细胞）从组织中分离出来在体外进行培养扩增，然后将扩增的细胞与具有良好生物相容性、可降解性和可吸收的生物材料（支架）按一定的比例混合，使细胞黏附在生物材料（支架）上形成细胞-材料复合物；将该复合物植入机体的组织或器官病损部位，随着生物材料在体内逐渐被降解和吸收，植入的细胞在体内不断增殖并分泌细胞外基质，最终形成相应的组织或器官，从而达到修复创伤和重建功能的目的。生物材料支架所形成的三维结构为细胞获取营养、生长和代谢提供了良好的环境。

现有方法制备的生物材料支架即胶原支架的总表面积较小且结构可靠性差，另外，现有方法仅能够对单一原材料组织处理制备，适用范围小。

发明内容

基于上述现状，本发明的主要目的在于提供一种胶原支架的制备方法，以解决现有制备方法存在的上述问题。

为实现上述目的，本发明采用的技术方案如下：

本发明的第一方面提供了一种胶原支架的制备方法，所述制备方法包括步骤：

S100、对原材料组织进行清洗；

S200、对清洗后的原材料组织进行冻融循环处理得到第一中间物；

S300、对所述第一中间物进行脱脂处理得到第二中间物；

S400、对所述第二中间物进行脱细胞处理得到第三中间物；

S500、对所述第三中间物进行脱核酸处理得到第四中间物；

S600、将所述第四中间物进行洗涤和干燥处理，得到所述胶原支架；

其中，所述步骤 S500 中采用全能核酸酶溶液进行所述脱核酸处理，所述全能核酸酶的含量为100 U/L 至10000U/L，例如为100 U/L、500 U/L、1000 U/L、1500 U/L、2000 U/L、2500 U/L、3000 U/L、3500 U/L、4000 U/L、4500 U/L、5000 U/L、5500 U/L、6000 U/L、6500 U/L、7000 U/L、7500 U/L、8000 U/L、8500 U/L、9000 U/L、9500 U/L、10000 U/L。

首先对原材料组织进行冻融循环处理，在冻融循环过程中形成结冰以及通过冻融循环的盐溶液的浓度变化（冻融循环的冷冻过程中随着温度下降会导致未结冰水中的盐的溶解度出现变化，盐浓度逐渐上升，产生细胞膜内外浓度差）使得细胞破裂，从而提高细胞裂解效果，获得更大的总表面积，从而更有利于组织的再生。

其次，由于不同的原材料组织的主要不同在于 DNA 和 RNA 不同，本申请的制备方法中设置有特定的脱核酸步骤，在该步骤利用全能核酸酶进行脱核酸处理，从而能够降解所有形式的 DNA 和 RNA，通用性强，适用范围广，可以适用于不同的单一原材料组织以及各种不同原材料组织的组合处理。原材料组织可以为猪、牛、羊等哺乳动物的适于作为原材料的组织或器官，例如心脏、肝脏、肾脏、膀胱、膈肌、大网膜、肠系膜等。

优选地，在所述步骤 S200 中，将清洗后的原材料组织加入到含有三羟甲基氨基甲烷和苯甲基磺酰氟且 PH 值为 7.8 至 8.2 的缓冲液中进行所述冻融循环，PH 值例如为 7.8、7.9、8、8.1、8.2；

采用上述缓冲液一方面能够提高细胞裂解效果，另一方面苯甲基磺酰氟的添加能够为组织提供一个稳定的环境，避免细胞内释放的蛋白酶对原材料组织的其他蛋白质结构（构成基质材料的结构）造成破坏，从而保证生成的胶原支架的三维空间更加稳固。

优选地，所述缓冲液中，所述三羟甲基氨基甲烷的摩尔浓度为 1mmol/L 至 20mmol/L，例如可以为 1mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L、5 mmol/L、

6 mmol/L、7 mmol/L、8 mmol/L、9 mmol/L、10 mmol/L、11 mmol/L、12 mmol/L、13 mmol/L、14 mmol/L、15 mmol/L、16 mmol/L、17 mmol/L、18 mmol/L、19 mmol/L、20 mmol/L，进一步优选为 8mmol/L 至 12 mmol/L，更进一步优选为 10 mmol/L，所述苯甲基磺酰氟的质量百分比为 0.1%至 1%，例如质量百分比为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%，进一步优选为 0.8%至 1%，更进一步优选为 1%。

优选地，所述缓冲液中还含有乙二胺四乙酸，所述乙二胺四乙酸的摩尔浓度为 1mmol/L 至 10mmol/L，例如为 1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L、5mmol/L、6mmol/L、7mmol/L、8mmol/L、9mmol/L、10mmol/L，进一步优选为 8mmol/L 至 10mmol/L，更进一步优选为 10mmol/L。

利用乙二胺四乙酸来调节缓冲液的 PH 值，使其 PH 值控制在 7.8 至 8.2 范围内，另外，由于乙二胺四乙酸具有抑制作用，采用其进行 PH 值调节能够避免因引入新的物质而对原材料组织的其他蛋白质结构（构成胶原支架的结构）造成破坏，从而进一步保证生成的胶原支架的三维空间更加稳固。

优选地，所述冻融循环中一次冻融循环包括：首先在-80°C 至-20°C 温度条件下进行 1 至 8 小时的冷冻处理，冷冻处理的温度例如可以为-80°C、-75°C、-70°C、-65°C、-60°C、-55°C、-50°C、-45°C、-40°C、-35°C、-30°C、-25°C、-20°C，冷冻处理的时长例如可以为 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时；然后在 30° C 至 40° C 温度条件下进行 0.5 至 1 小时的融化处理，融化处理的温度例如可以为 30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C，融化处理的时长例如可以为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时。

优选地，冻融循环的次数可以为 2-3 次，进一步优选为 3 次。

冻融循环虽然是一种现有的处理技术，但对于要求比较苛刻的胶原支架，融化温度过高会导致蛋白质变性，融化温度过低会导致融解不完全，因苯甲基磺酰氟这种蛋白酶抑制剂半衰期太短，如若融化处理时间过长，会导致细胞裂解后的细胞内蛋白酶对细胞外基质酶解，因此，现有的胶原支架的制备过程中并没有采用这一技术，本申请中，通过对温度和时长的限制，使得冻融循环能够很好的使得细胞破裂且不会对细胞外基质造成破坏。

优选地，所述步骤 S300 包括步骤：

S310、采用升浓度梯度的方式利用乙醇对所述第一中间物进行洗涤；

S320、采用丙酮、己烷对经所述步骤 S310 洗涤后的组织进行脱脂处理；

S330、采用降浓度梯度的方式利用乙醇对所述步骤 S320 处理后的组织进行洗涤得到所述第二中间物。

步骤 S310 能够使得组织脱水，采用升梯度乙醇洗涤能够避免直接使用高浓度乙醇使得细胞快速失水形成致密层而影响脱水效果，步骤 S330 能够使得脱脂后的组织水化，从而恢复基质原有状态，保护基质的原有性能。

优选地，所述步骤 S310 包括：

S311、利用浓度 50%至 70%的乙醇对所述第一中间物进行洗涤得到中间物Ⅰ，乙醇浓度例如为 50%、55%、60%、65%、70%；

S312、利用浓度 99%至 100%的乙醇对所述中间物Ⅰ进行洗涤得到中间物Ⅱ，乙醇浓度例如为 99%、99.2%、99.4%、99.6%、99.8%、100%；

优选地，所述步骤 S311 中对所述第一中间物洗涤一次，一次的洗涤时长为 0.5 小时至 1 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时；

优选地，所述步骤 S312 中对所述中间物Ⅰ洗涤 2 至 3 次，每次的洗涤时长为 0.5 小时至 1 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时。

其中，步骤 S311 实现脱水，步骤 S312 中利用高浓度乙醇进行洗涤能够尽可能把组织中的水带走，从而防止后续脱脂过程形成油包水（即溶剂包围着含水组织）而导致脱脂不完全。

优选地，所述步骤 S320 包括步骤：

S321、采用丙酮萃取所述中间物Ⅱ中的极性脂肪，得到中间物Ⅲ；

S322、采用己烷和丙酮的混合物萃取所述中间物Ⅲ中的非极性脂肪，得到中间物Ⅳ；

优选地，所述步骤 S321 中，采用浓度为 99%至 100%的丙酮对所述中间物Ⅱ洗涤 1 至 3 次，每次洗涤时长为 0.5 小时至 1 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时；

优选地，所述步骤 S322 中，采用己烷和丙酮的混合物对所述中间物Ⅲ洗涤 1 至 3 次，每次洗涤时长为 4 小时至 16 小时，例如为 4 小时、5 小时、6

小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时；

优选地，所述步骤 S322 中，己烷与丙酮的质量比为 1～4:1～3，例如为 1:1、1:2、1:3、2:1、2:3、3:1、3:2、4:1、4:3。采用该比例范围的组合能够实现更加快速有效的非极性脂肪的萃取。

优选地，所述步骤 S330 包括步骤：

S331、利用浓度 99%至 100%的乙醇对所述中间物Ⅳ进行洗涤得到中间物Ⅴ，乙醇浓度例如为 99%、99.2%、99.4%、99.6%、99.8%、100%；

S332、利用浓度 50%至 70%的乙醇对所述中间物Ⅴ进行洗涤得到所述第二中间物，乙醇浓度例如为 50%、55%、60%、65%、70%；

步骤 S331 中利用高浓度乙醇能够将己烷和丙酮洗掉，以利于步骤 S332 中利用低浓度乙醇对组织的水化过程

优选地，所述步骤 S331 中，对所述中间物Ⅳ洗涤一次，一次的洗涤时长为 0.5 小时至 1 小时；

优选地，所述步骤 S332 中，在 2° C 至 40° C 的温度环境下，对所述中间物Ⅴ洗涤一次，一次的洗涤时长为 8 小时至 24 小时，例如为 8 小时、10 小时、12 小时、14 小时、16 小时、18 小时、20 小时、22 小时、24 小时。由于乙醇的穿透力强于水，因此脱水比水化过程快，因此步骤 S332 持续的时间较长。

优选地，所述步骤 S400 包括步骤：

S410、采用 PH 值为 7 至 8.2 的磷酸缓冲盐溶液对所述第二中间物进行洗涤得到中间物 A，PH 值例如为 7、7.2、7.4、7.6、7.8、8、8.2，通过该步骤能够去除上一步骤残留的乙醇；

S420、采用含有三羟甲基氨基甲烷和乙二胺四乙酸的溶液对所述中间物 A 进行洗涤得到中间物 B；

S430、采用含有十二烷基硫酸钠的溶液对所述中间物 B 进行洗涤得到中间物 C；

S440、采用含有脱氧胆酸钠的磷酸缓冲盐溶液对所述中间物 C 进行洗涤得到中间物 D；

S450、采用磷酸缓冲盐溶液对所述中间物 D 进行洗涤得到所述第三中间

物；

优选地，在所述步骤 S410 中，对所述第二中间物洗涤 1 至 4 次，每次持续时长为 0.5 小时至 1 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时；

优选地，在所述步骤 S420 中，所述三羟甲基氨基甲烷的含量为 1mmol/L 至 20mmol/L，例如 1mmol/L、3 mmol/L、5 mmol/L、7 mmol/L、9 mmol/L、11 mmol/L、13 mmol/L、15 mmol/L、17 mmol/L、19 mmol/L、20 mmol/L，所述乙二胺四乙酸的含量为 1mmol/L 至 10mmol/L，例如 1 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L、4 mmol/L、5 mmol/L、6 mmol/L、7 mmol/L、8 mmol/L、9 mmol/L、10 mmol/L，洗涤时长为 0.5 小时至 4 小时，例如为 0.5 小时、1 小时、1.5 小时、2 小时、2.5 小时、3 小时、3.5 小时、4 小时；低浓度的 Tris-EDTA 使得组织细胞通过渗透压补水，使组织舒张更有利于后续脱细胞。

优选地，在所述步骤 S430 中，所述十二烷基硫酸钠的质量百分比为 0.5% 至 1.5%，例如为 0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%，洗涤次数为 2 至 3 次，每次洗涤持续时长为 8 小时至 24 小时，例如为 8 小时、10 小时、12 小时、14 小时、16 小时、18 小时、20 小时、22 小时、24 小时；

优选地，在所述步骤 S440 中，所述脱氧胆酸钠的含量为 1mmol/L 至 10mmol/L，例如为 1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L、5mmol/L、6mmol/L、7mmol/L、8mmol/L、9mmol/L、10mmol/L，洗涤次数为 1 至 3 次，每次洗涤持续时长为 0.5 小时至 2 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时、1.1 小时、1.2 小时、1.3 小时、1.4 小时、1.5 小时、1.6 小时、1.7 小时、1.8 小时、1.9 小时、2 小时；

十二烷基硫酸钠和脱氧胆酸钠能够溶解细胞和核膜，两者联用可有效地去除致密组织中的细胞质蛋白。

优选地，在所述步骤 S450 中，洗涤次数为 2 至 3 次，每次洗涤持续时长为 0.5 小时至 2 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时、1.1 小时、1.2 小时、1.3 小时、1.4 小时、1.5 小时、1.6 小时、1.7 小时、1.8 小时、1.9 小时、2 小时。

磷酸缓冲盐溶液用于洗去残留的十二烷基硫酸钠和脱氧胆酸钠。

优选地，所述步骤 S500 包括步骤：

S510、采用含有三羟甲基氨基甲烷和镁盐且 PH 值为 7.8 至 8.2 的缓冲液对所述第三中间物进行洗涤得到中间物 a，PH 值例如为 7.8、7.9、8、8.1、8.2；

S520、在 30° C 至 42° C 的环境下，例如 30° C、31° C、32° C、33° C、34° C、35° C、36° C、37° C、38° C、39° C、40° C、41° C、42° C；采用含有三羟甲基氨基甲烷、镁盐、牛血清白蛋白和全能核酸酶且 PH 值为 7.8 至 8.2 的溶液中对所述中间物 a 进行洗涤得到所述第四中间物，PH 值例如为 7.8、7.9、8、8.1、8.2；

优选地，在所述 S510 中，所述三羟甲基氨基甲烷的含量为 30mmol/L 至 60mmol/L，例如为 30mmol/L、35 mmol/L、40 mmol/L、45 mmol/L、50 mmol/L、55 mmol/L、60 mmol/L，所述镁盐中的二价镁离子的含量为 1mmol/L 至 10mmol/L，例如为 1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L、5mmol/L、6mmol/L、7mmol/L、8mmol/L、9mmol/L、10mmol/L，洗涤时长为 0.5 小时至 2 小时，；

优选地，在所述 S520 中，所述三羟甲基氨基甲烷的含量为 30mmol/L 至 60mmol/L，例如为 30mmol/L、35 mmol/L、40 mmol/L、45 mmol/L、50 mmol/L、55 mmol/L、60 mmol/L，所述镁盐中的二价镁离子的含量为 1mmol/L 至 10mmol/L，例如为 1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L、5mmol/L、6mmol/L、7mmol/L、8mmol/L、9mmol/L、10mmol/L，所述牛血清白蛋白的质量百分比为 0.01%至 1%，例如为 0.01%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%、0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1%，洗涤时长为 8 小时至 48 小时，例如为 8 小时、10 小时、15 小时、20 小时、25 小时、30 小时、35 小时、40 小时、45 小时、48 小时。

细胞核是细胞物质集中的地方，浓度很高，故采用高渗 Tris 溶液，全能核酸酶能降解所有形式的 DNA 和 RNA，牛血清白蛋白（BSA）能提高酶活性、使酶切更完全，同时核酸酶的活性依赖于 Mg^{2+}的存在。

优选地，所述步骤 S600 包括步骤：

S610、采用含有三羟甲基氨基甲烷、PH 值为 7.8 至 8.2 的溶液对所述第四中间物进行清洗得到中间物 b，PH 值例如为 7.8、7.9、8、8.1、8.2，利用三羟甲基氨基甲烷可以将核酸酶、牛血清白蛋白、酶解产物、镁离子洗掉；

S620、采用 PH 值为 7 至 8.2 的磷酸缓冲盐溶液对所述中间物 b 进行洗涤得到中间物 c，PH 值例如为 7、7.2、7.4、7.6、7.8、8、8.2，磷酸缓冲盐溶液可以洗掉三羟甲基氨基甲烷以及步骤 S610 中三羟甲基氨基甲烷洗不掉的物质洗掉；

S630、采用双蒸水对所述中间物 c 进行洗涤得到中间物 d，双蒸水可以洗掉磷酸缓冲盐溶液；

S640、对所述中间物 d 进行冻干处理得到所述胶原支架；

优选地，所述步骤 S610 中洗涤次数为 1 至 3 次，每次持续时长为 0.5 至 2 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时、1.1 小时、1.2 小时、1.3 小时、1.4 小时、1.5 小时、1.6 小时、1.7 小时、1.8 小时、1.9 小时、2 小时；

优选地，所述步骤 S620 中洗涤次数为 1 至 3 次，每次持续时长为 0.5 至 2 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时、1.1 小时、1.2 小时、1.3 小时、1.4 小时、1.5 小时、1.6 小时、1.7 小时、1.8 小时、1.9 小时、2 小时；

优选地，所述步骤 S630 中洗涤次数为 1 至 3 次，每次持续时长为 0.5 至 2 小时，例如为 0.5 小时、0.6 小时、0.7 小时、0.8 小时、0.9 小时、1 小时、1.1 小时、1.2 小时、1.3 小时、1.4 小时、1.5 小时、1.6 小时、1.7 小时、1.8 小时、1.9 小时、2 小时。

优选地，上述的洗涤过程中，无另说明的，PBS 的 PH 为 7 至 8.2，例如为 7、7.2、7.4、7.6、7.8、8、8.2，洗涤过程在温度 0~40℃、50~200rpm 的震荡箱或轨道式摇床中进行。

经实验，采用本申请提供的制备方法制备的胶原支架，其构成的三维空间可以促进种子细胞的增殖与迁移、提高种子细胞按照其原始表型表达的稳定性，促进细胞基质的分泌从而增加支架的坚固性。此外，该胶原支架还具有良好的生物相容性，良好的降解性能，与宿主整合能力强等特点。

本发明的第二方面提供了一种胶原支架，由上述的制备方法制备。

附图说明

以下将参照附图对本发明的优选实施方式进行描述。图中：

图 1 为本发明提供的胶原支架的制备方法的流程图。

具体实施方式

以下基于实施例对本发明进行描述，但是本发明并不仅仅限于这些实施例。在下文对本发明的细节描述中，详尽描述了一些特定的细节部分，为了避免混淆本发明的实质，公知的方法、过程、流程、元件并没有详细叙述。

此外，本领域普通技术人员应当理解，在此提供的附图都是为了说明的目的，并且附图不一定是按比例绘制的。

除非上下文明确要求，否则整个说明书和权利要求书中的“包括”、“包含”等类似词语应当解释为包含的含义而不是排他或穷举的含义；也就是说，是“包括但不限于”的含义。

在本发明的描述中，需要理解的是，术语“第一”、“第二”等仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性。此外，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

针对现有胶原支架的制备方法适用范围小、制备出的胶原支架的总表面积较小且结构可靠性差的问题，本申请提供了一种胶原支架的制备方法以及采用该制备方法制备的胶原支架。如图 1 所示，该制备方法包括步骤：

S100、对原材料组织进行清洗；

S200、对清洗后的原材料组织进行冻融循环处理得到第一中间物；

S300、对所述第一中间物进行脱脂处理得到第二中间物；

S400、对所述第二中间物进行脱细胞处理得到第三中间物；

S500、对所述第三中间物进行脱核酸处理得到第四中间物；

S600、将所述第四中间物进行洗涤和干燥处理，得到所述胶原支架；

其中，所述步骤 S500 中采用全能核酸酶进行所述脱核酸处理，所述全能核酸酶的含量为 100 U/L 至 10000U/L。

下面给出该制备方法的具体实施例：

实施例一

将新鲜猪大网膜用生理盐水洗涤 3 次；

将完成洗涤的大网膜加入到含 10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris）、10 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）以及质量百分比 1%苯甲基磺酰氟（PMSF）

的 pH=8.0 的缓冲液中冻融循环 3 次，其中，一次冻融循环中冷冻温度为-80℃，持续时长为 1 小时，融化温度为 37℃，持续时长为 0.5 小时；

将冻融循环处理后的组织进行脱脂处理：

采用浓度 50%的乙醇洗涤 0.5 小时；

采用浓度 99%的乙醇洗涤 2 次，每次持续 0.5 小时；

采用浓度 99%的丙酮洗涤 1 次，持续 0.5 小时；

采用质量比 1:1 的己烷和丙酮溶液洗涤 1 次，持续 4 小时；

采用浓度 99%的乙醇洗涤 0.5 小时；

在 2° C 的环境下采用浓度 50%的乙醇洗涤 8 小时。

将脱脂处理后的组织进行脱细胞处理：

采用 PH 值为 7 的磷酸缓冲盐溶液洗涤 1 次，持续 0.5 小时；

采用含有 1mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷、1mmol/L 的乙二胺四乙酸的溶液洗涤 0.5 小时；

采用十二烷基硫酸钠质量百分比 0.5%的溶液洗涤 1 次，持续 8 小时；

采用含有 1mmol/L 的脱氧胆酸钠的磷酸缓冲盐溶液洗涤 1 次，持续 0.5 小时；

采用磷酸缓冲盐溶液洗涤 1 次，持续 0.5 小时。

将脱脂处理后的组织进行脱核酸处理：

采用含有 30mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、1mmol/L 镁离子的镁盐、PH 值为 7.8 的缓冲液洗涤 0.5 小时；

在 30° C 环境下采用含有 30mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、1mmol/L 镁离子的镁盐、质量百分数 0.01%牛血清白蛋白、100U/L 全能核酸、PH 值 7.8 的溶液中洗涤 8 小时。

将脱核酸处理后的组织进行洗涤冻干处理：

采用 PH 值 7.8、含有 30mmol/L 三羟甲基氨基甲烷的溶液洗涤 1 次，持续 0.5 小时；

采用 PH 值 7 的磷酸缓冲盐溶液洗涤 1 次，持续 0.5 小时；

采用双蒸水洗涤 1 次，持续 0.5 小时；

冻干处理得到胶原支架。

实施例二

将新鲜猪心脏组织用生理盐水洗涤 3 次；

将完成洗涤的心脏组织加入到含 1 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris）、1 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）以及质量百分比 0.1%苯甲基磺酰氟（PMSF）的 pH=7.8 的缓冲液中冻融循环 3 次，其中，一次冻融循环中冷冻温度为-20℃，持续时长为 8 小时，融化温度为 30℃，持续时长为 1 小时；

将冻融循环处理后的组织进行脱脂处理：

采用浓度 70%的乙醇洗涤 1 小时；

采用浓度 100%的乙醇洗涤 3 次，每次持续 1 小时；

采用浓度 100%的丙酮洗涤 3 次，持续 1 小时；

采用质量比 4:3 的己烷和丙酮溶液洗涤 3 次，持续 16 小时；

采用浓度 100%的乙醇洗涤 1 小时；

在 40° C 的环境下采用浓度 70%的乙醇洗涤 24 小时。

将脱脂处理后的组织进行脱细胞处理：

采用 PH 值为 8.2 的磷酸缓冲盐溶液洗涤 4 次，每次持续 1 小时；

采用含有 20mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷、10mmol/L 的乙二胺四乙酸的溶液洗涤 4 小时；

采用十二烷基硫酸钠质量百分比 1.5%的溶液洗涤 3 次，每次持续 24 小时；

采用含有 10mmol/L 的脱氧胆酸钠的磷酸缓冲盐溶液洗涤 3 次，每次持续 2 小时；

采用磷酸缓冲盐溶液洗涤 3 次，每次持续 2 小时。

将脱脂处理后的组织进行脱核酸处理：

采用含有 60mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、10mmol/L 镁离子的镁盐、PH 值为 8.2 的缓冲液洗涤 2 小时；

在 42° C 环境下采用含有 60mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、10mmol/L 镁离子的镁盐、质量百分数 1%牛血清白蛋白、10000U/L 全能核酸、PH 值 8.2 溶液中洗涤 48 小时。

将脱核酸处理后的组织进行洗涤冻干处理：

采用 PH 值 8.2、含有 60mmol/L 三羟甲基氨基甲烷的溶液洗涤 3 次，每次持续 2 小时；

采用 PH 值 8.2 的磷酸缓冲盐溶液洗涤 3 次，每次持续 2 小时；

采用双蒸水洗涤 3 次，每次持续 2 小时；

冻干处理得到胶原支架。

实施例三

将新鲜猪膀胱组织用生理盐水洗涤 3 次；

将完成洗涤的膀胱组织加入到含 20mmol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris）、8mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）以及质量百分比 0.8%苯甲基磺酰氟（PMSF）的 pH=8.2 的缓冲液中冻融循环 3 次，其中，一次冻融循环中冷冻温度为-50℃，持续时长为 5 小时，融化温度为 40℃，持续时长为 0.8 小时；

将冻融循环处理后的组织进行脱脂处理：

采用浓度 60%的乙醇洗涤 0.8 小时；

采用浓度 99.5%的乙醇洗涤 2 次，每次持续 0.8 小时；

采用浓度 99.5%的丙酮洗涤 2 次，持续 0.8 小时；

采用质量比 2:3 的己烷和丙酮溶液洗涤 2 次，持续 10 小时；

采用浓度 99.5%的乙醇洗涤 0.8 小时；

在 20° C 的环境下采用浓度 60%的乙醇洗涤 12 小时。

将脱脂处理后的组织进行脱细胞处理：

采用 PH 值为 8 的磷酸缓冲盐溶液洗涤 2 次，每次持续 0.8 小时；

采用含有 10mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷、8mmol/L 的乙二胺四乙酸的溶液洗涤 2 小时；

采用十二烷基硫酸钠质量百分比 1%的溶液洗涤 2 次，每次持续 12 小时；

采用含有 8mmol/L 的脱氧胆酸钠的磷酸缓冲盐溶液洗涤 2 次，每次持续 1 小时；

采用磷酸缓冲盐溶液洗涤 2 次，每次持续 1 小时。

将脱脂处理后的组织进行脱核酸处理：

采用含有 45mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、8mmol/L 镁离子的镁盐、PH 值为 8 的缓冲液洗涤 1 小时；

在 38° C 环境下采用含有 45mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、8mmol/L 镁离子的镁盐、质量百分数 0.1%牛血清白蛋白、5000U/L 全能核酸、PH 值 8 溶液中洗涤 25 小时。

将脱核酸处理后的组织进行洗涤冻干处理：

采用 PH 值 8、含有 45mmol/L 三羟甲基氨基甲烷的溶液洗涤 2 次，每次持续 1 小时；

采用 PH 值 8 的磷酸缓冲盐溶液洗涤 2 次，每次持续 1 小时；

采用双蒸水洗涤 2 次，每次持续 1 小时；

冻干处理得到胶原支架。

本领域的技术人员能够理解的是，在不冲突的前提下，上述各优选方案可以自由地组合、叠加。

应当理解，上述的实施方式仅是示例性的，而非限制性的，在不偏离本发明的基本原理的情况下，本领域的技术人员可以针对上述细节做出的各种明显的或等同的修改或替换，都将包含于本发明的权利要求范围内。

权 利 要 求 书

1.一种胶原支架的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括步骤：

S100、对原材料组织进行清洗；

S200、对清洗后的原材料组织进行冻融循环处理得到第一中间物；

S300、对所述第一中间物进行脱脂处理得到第二中间物；

S400、对所述第二中间物进行脱细胞处理得到第三中间物；

S500、对所述第三中间物进行脱核酸处理得到第四中间物；

S600、将所述第四中间物进行洗涤和干燥处理，得到所述胶原支架；

其中，所述步骤 S500 中采用全能核酸酶溶液进行所述脱核酸处理，所述全能核酸酶的含量为 100 U/L 至 10000U/L。

2.根据权利要求 1 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，在所述步骤 S200 中，将清洗后的原材料组织加入到含有三羟甲基氨基甲烷和苯甲基磺酰氟且 PH 值为 7.8 至 8.2 的缓冲液中进行所述冻融循环。

3.根据权利要求 1 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，所述步骤 S300 包括步骤：

S310、采用升浓度梯度的方式利用乙醇对所述第一中间物进行洗涤；

S320、采用丙酮、已烷对经所述步骤 S310 洗涤后的组织进行脱脂处理；

S330、采用降浓度梯度的方式利用乙醇对所述步骤 S320 处理后的组织进行洗涤得到所述第二中间物。

4.根据权利要求 3 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，所述步骤 S310 包括：

S311、利用浓度 50%至 70%的乙醇对所述第一中间物进行洗涤得到中间物Ⅰ；

S312、利用浓度 99%至 100%的乙醇对所述中间物Ⅰ进行洗涤得到中间物Ⅱ。

5.根据权利要求 4 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，所述步骤 S320 包括步骤：

S321、采用丙酮萃取所述中间物Ⅱ中的极性脂肪，得到中间物Ⅲ；

S322、采用己烷和丙酮的混合物萃取所述中间物Ⅲ中的非极性脂肪，得到

中间物Ⅳ。

6.根据权利要求 5 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，所述步骤S330 包括步骤：

S331、利用浓度 99%至 100%的乙醇对所述中间物Ⅳ进行洗涤得到中间物Ⅴ；

S332、利用浓度 50%至 70%的乙醇对所述中间物Ⅴ进行洗涤得到所述第二中间物。

7.根据权利要求 1 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，所述步骤S400 包括步骤：

S410、采用 PH 值为 7 至 8.2 的磷酸缓冲盐溶液对所述第二中间物进行洗涤得到中间物 A；

S420、采用含有三羟甲基氨基甲烷和乙二胺四乙酸的溶液对所述中间物 A 进行洗涤得到中间物 B；

S430、采用含有十二烷基硫酸钠的溶液对所述中间物 B 进行洗涤得到中间物 C；

S440、采用含有脱氧胆酸钠的磷酸缓冲盐溶液对所述中间物 C 进行洗涤得到中间物 D；

S450、采用磷酸缓冲盐溶液对所述中间物 D 进行洗涤得到所述第三中间物。

8.根据权利要求 1 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，所述步骤S500 包括步骤：

S510、采用含有三羟甲基氨基甲烷和镁盐且 PH 值为 7.8 至 8.2 的缓冲液对所述第三中间物进行洗涤得到中间物 a；

S520、在 30° C 至 42° C 的环境下，采用含有三羟甲基氨基甲烷、镁盐、牛血清白蛋白和全能核酸酶且 PH 值为 7.8 至 8.2 的溶液中对所述中间物 a 进行洗涤得到所述第四中间物。

9.根据权利要求 1 所述的胶原支架的制备方法，其特征在于，所述步骤S600 包括步骤：

S610、采用含有三羟甲基氨基甲烷、PH 值为 7.8 至 8.2 的溶液对所述第四中间物进行清洗得到中间物 b；

S620、采用 PH 值为 7 至 8.2 的磷酸缓冲盐溶液对所述中间物 b 进行洗涤

得到中间物 c；

S630、采用双蒸水对所述中间物 c 进行洗涤得到中间物 d；

S640、对所述中间物 d 进行冻干处理得到所述胶原支架。

10.一种胶原支架，其特征在于，由如权利要求 1 至 9 任一项所述的制备方法制备。

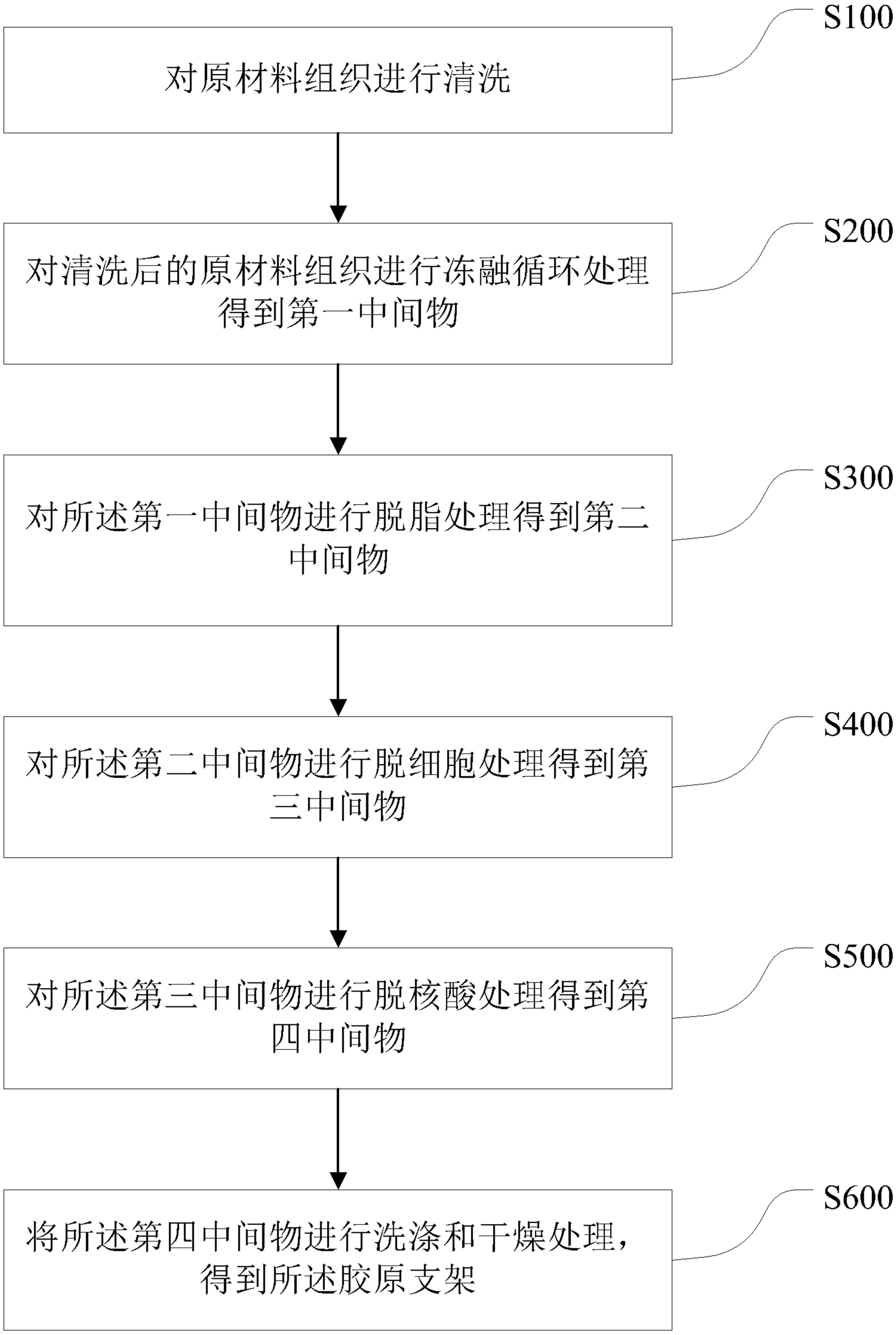

对原材料组织进行清洗
S100
对清洗后的原材料组织进行冻融循环处理得到第一中间物
S200
对所述第一中间物进行脱脂处理得到第二中间物
S300
对所述第二中间物进行脱细胞处理得到第三中间物
S400
对所述第三中间物进行脱核酸处理得到第四中间物
S500
将所述第四中间物进行洗涤和干燥处理，得到所述胶原支架
S600

图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/123741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/36(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; A61L 27/58(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L 27/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, TWABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, GBTXT, JPABS, 中国期刊网全文数据库, ISI Web of Science: inventor, applicant, 胶原, 细胞外基质, 脱细胞, 去细胞, 三羟甲基氨基甲烷, 乙二胺四乙酸, 冻融, 苯甲基磺酰氟, 蛋白酶保护剂, 乙醇, 丙酮, 己烷, 浓度梯度, 脱脂, 十二烷基硫酸钠, 脱氧胆酸钠, 核酸酶, 脱核酸, DNA酶, RNA酶, Collagen, ECM, extracellular+, acelluar+, decellular+, tris, EDTA, freeze, froze?, thaw+, phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, enzyme inhibitor, ethanol, concentrat+ 2d gradient, acetone, hexane, sodium dodecyl sulfate, SDS, sodium deoxycholate, nuclease, DNAse, RNAse

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 107376022 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 24 November 2017 (2017-11-24) description, paragraphs 11-19	1-2, 7-10
Y	CN 108310465 A (WENZHOU INSTITUTE OF BIOMATERIALS & ENGINEERING, CNITECH, CAS) 24 July 2018 (2018-07-24) description, paragraph 18	1-2, 7-10
Y	US 2008306610 A1 (ZIMMER ORTHOBIOLOGICS, INC.) 11 December 2008 (2008-12-11) claims 1, 4-9, 11	2, 7, 10
PX	CN 111434358 A (GUANGDONG HONGZHI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 21 July 2020 (2020-07-21) claims 1-10	1-10
A	CN 110193096 A (SHANGHAI SIXTH PEOPLE'S HOSPITAL) 03 September 2019 (2019-09-03) entire document	1-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 January 2021	**27 January 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/123741

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 3095469 B1 (INCI, I.) 11 September 2019 (2019-09-11) entire document	1-10
A	WO 2019180568 A1 (INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY HYDERABAD) 28 November 2019 (2019-11-28) entire document	1-10
A	CN 110384826 A (CHINA MEDICAL UNIVERSITY) 29 October 2019 (2019-10-29) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/123741

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107376022	A	24 November 2017	None			
CN	108310465	A	24 July 2018	None			
US	2008306610	A1	11 December 2008	WO	2008154149	A2	18 December 2008
CN	111434358	A	21 July 2020	None			
CN	110193096	A	03 September 2019	None			
EP	3095469	B1	11 September 2019	US	2017021059	A1	26 January 2017
				US	9968707	B2	15 May 2018
				EP	3095469	A1	23 November 2016
WO	2019180568	A1	28 November 2019	IN	201841009835	A	20 August 2019
CN	110384826	A	29 October 2019	None			

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/123741

A. 主题的分类

A61L 27/36(2006.01)i；A61L 27/50(2006.01)i；A61L 27/58(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61L 27/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS，TWABS，DWPI，SIPOABS，CNTXT，TWTXT，USTXT，WOTXT，EPTXT，GBTXT，JPABS，中国期刊网全文数据库，ISI Web of Science:发明人，申请人，胶原，细胞外基质，脱细胞，去细胞，三羟甲基氨基甲烷,乙二胺四乙酸，冻融,苯甲基磺酰氟，蛋白酶保护剂，乙醇，丙酮,己烷,浓度梯度,脱脂，十二烷基硫酸钠，脱氧胆酸钠，核酸酶,脱核酸，DNA酶，RNA酶，Collagen，ECM，extracellular+， acelluar+，decellular+，tris，EDTA，freeze，froze?，thaw+，phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF,enzyme inhibitor，ethanol，concentrat+ 2d gradient，acetone，hexane，sodium dodecyl sulfate，SDS，sodium deoxycholate，nuclease，DNAse，RNAse

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 107376022 A (浙江大学) 2017年 11月 24日 (2017-11-24) 说明书第11-19段	1-2，7-10
Y	CN 108310465 A (温州生物材料与工程研究所) 2018年 7月 24日 (2018-07-24) 说明书第18段	1-2，7-10
Y	US 2008306610 A1 (ZIMMER ORTHOBIOLOGICS，INC.) 2008年 12月 11日 (2008-12-11) 权利要求1、4-9、11	2，7，10
PX	CN 111434358 A (广东泓志生物科技有限公司) 2020年 7月 21日 (2020-07-21) 权利要求1-10	1-10
A	CN 110193096 A (上海市第六人民医院) 2019年 9月 3日 (2019-09-03) 全文	1-10
A	EP 3095469 B1 (INCI， I.) 2019年 9月 11日 (2019-09-11) 全文	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 1月 7日	2021年 1月 27日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 张凌 电话号码 86-（10）53962675

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/123741

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2019180568 A1 (INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY HYDERABAD) 2019年 11月 28日 (2019-11-28) 全文	1-10
A	CN 110384826 A (中国医科大学) 2019年 10月 29日 (2019-10-29) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/123741

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107376022	A	2017年 11月 24日	无			
CN	108310465	A	2018年 7月 24日	无			
US	2008306610	A1	2008年 12月 11日	WO	2008154149	A2	2008年 12月 18日
CN	111434358	A	2020年 7月 21日	无			
CN	110193096	A	2019年 9月 3日	无			
EP	3095469	B1	2019年 9月 11日	US	2017021059	A1	2017年 1月 26日
				US	9968707	B2	2018年 5月 15日
				EP	3095469	A1	2016年 11月 23日
WO	2019180568	A1	2019年 11月 28日	IN	201841009835	A	2019年 8月 20日
CN	110384826	A	2019年 10月 29日	无			